

ANTI-HUMAN NERVE GROWTH FACTOR MONOCLONAL ANTIBODY

Patent number: JP5076384
Publication date: 1993-03-30
Inventor: KOTOMURA NAOE; FUJIMORI KIYOSHI; FUKUZONO SHINICHI; SHIMIZU NORIO
Applicant: HITACHI LTD
Classification:
- international: **C12N5/20; C12N15/06; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/577; C12N5/20; C12N15/06; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/577; (IPC1-7): C12N5/20; C12N15/06; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/577**
- european:
Application number: JP19910241136 19910920
Priority number(s): JP19910241136 19910920

Report a data error here

Abstract of JP5076384

PURPOSE: To obtain a new anti-human NGF monoclonal antibody capable of recognizing human NGF. **CONSTITUTION:** An anti-human nerve growth factor monoclonal antibody prepared by using a fusion type human nerve growth factor (one prepared by adding a total of 8 amino acids of 6 amino acids at N end side of trpL polypeptide of tryptophane operon, glutamic acid and phenylalanine to the upper stream side of N end of human nerve growth factor) as an antigen. The anti-human nerve growth factor monoclonal antibody is obtained by culturing hybridoma 1-7-78 (FERM P-12,508).

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-76384

(43) 公開日 平成5年(1993)3月30日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 21/08		8214-4B		
G 0 1 N 33/53	B	8310-2J		
33/577	B	9015-2J		
		7236-4B	C 1 2 N 5/00	B
		8828-4B	15/00	C

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全 5 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平3-241136	(71) 出願人	000005108 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地
(22) 出願日	平成3年(1991)9月20日	(72) 発明者	琴村 直恵 埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会 社日立製作所基礎研究所内
		(72) 発明者	藤森 清 埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会 社日立製作所基礎研究所内
		(72) 発明者	福園 真一 埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会 社日立製作所基礎研究所内
		(74) 代理人	弁理士 小川 勝男

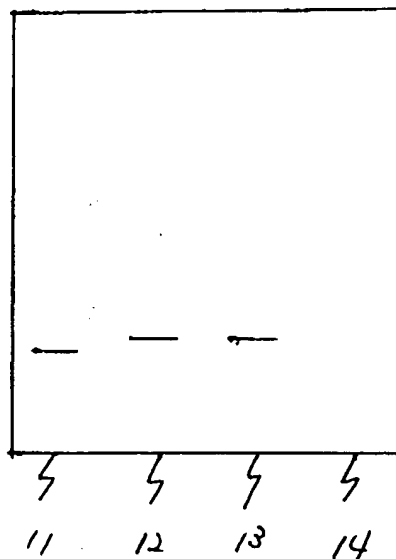
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗ヒト神経成長因子モノクローナル抗体

(57) 【要約】

【目的】 遺伝子工学的に生産したヒトNGFを認識する、抗ヒトNGFモノクローナル抗体を作製することを目的とする。

【構成】 融合型ヒトNGFを抗原としてマウスを免疫し、免疫された脾臓細胞をミエローマと細胞融合することでハイブリドーマを得る。その中より抗ヒトNGF抗体を産生するものをスクリーニングし、クローニングを行なう。クローンの培養上清液あるいは復水より抗ヒトNGFモノクローナル抗体を得る。



【特許請求の範囲】

【請求項1】融合型ヒト神経成長因子を抗原として作製した抗ヒト神経成長因子モノクローナル抗体。

【請求項2】請求項1記載の融合型ヒト神経成長因子が、ヒト神経成長因子のN末端上流側に、トリプトファンオベロンのIrpLポリペプチドのN末端側6個のアミノ酸とグルタミン酸とフェニルアラニンの合計8個のアミノ酸を付加したものであること。

【請求項3】請求項1記載の融合型ヒト神経成長因子が、遺伝子組換え大腸菌により生産されたものであること。

【請求項4】請求項1記載の抗ヒト神経成長因子モノクローナル抗体が、変性処理した神経成長因子を認識する抗体であること。

【請求項5】請求項1記載の抗ヒト神経成長因子モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット法によって、遺伝子組換え体から抽出したタンパク質中に存在するヒト神経成長因子を特異的に検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は遺伝子組換え大腸菌で生産したヒトの神経成長因子(Nerve GrowthFactor, 以下NGFと略す)を特異的に認識するモノクローナル抗体およびそれを用いたヒトNGFの検出方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】NGFは、交感神経細胞の生存と分化に関わるタンパク質であり、現在までにマウス、ウシ、ニワトリ等から単離されている。マウスNGFは分子量約14万で、 α 、 β 、 γ のサブユニットからなるが、 β サブユニットのみが神経成長因子としての生物活性を有している。このマウス β NGFの遺伝子と類似した遺伝子がヒトの遺伝子ライブラリーから単離され、これから推定されたヒトNGFの118個のアミノ酸配列もまたマウス β NGFと類似していることが示された。しかし、これまでに人体からのヒトNGFの単離に成功した例がないことから、その存在量はごく微量と考えられ、遺伝子工学による大量生産が検討されている。

【0003】遺伝子組換え体によって生産されたタンパク質の検出は、抗血清やモノクローナル抗体でなされる場合が多い。この際、目的のタンパク質の検出には、2-メルカプトエタノールとSDS(ドデシル硫酸ナトリウム)により変性処理したタンパク質を検出するウエスタンブロット法が一般に用いられている。これは、遺伝子工学的に生産されたヒトNGFについても同様である。

【0004】現在知られている抗NGFモノクローナル抗体としては、市販されているベリンガー・マンハイム山之内社製の抗マウスNGFモノクローナル抗体と、東ソーの抗NGFモノクローナル抗体(特開平2-21

9593)がある。前者は、マウスNGFの他、ウシやラットのNGFにも反応し、マウスNGFに対する中和活性がある。後者は、ヒトとマウスのNGFに反応し、両NGFに対して中和活性があると報告されている。両抗体は、NGFの検出、定量用試薬や阻害剤として使用されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】我々は、既に遺伝子組換え大腸菌によるヒトNGFの遺伝子工学的生産方法について特許を出願(特願平2-38358)している。従来技術で述べた抗マウスNGFモノクローナル抗体は、我々の遺伝子組換え大腸菌が生産した融合型ヒトNGFに対し非常に低い親和性しか示さなかった。そこで、遺伝子組換え大腸菌HB101[pTRLNGF](微工研寄第11283号)が生産した融合型ヒトNGFを抗原とし、ヒトNGFを認識する新たなモノクローナル抗体を作製することにした。

【0006】本発明は、ヒトNGFの検出に使用可能な、抗ヒトNGFモノクローナル抗体を提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】抗原には、遺伝子組換え大腸菌HB101[pTRLNGF]が生産した融合型ヒトNGFを用いた。このプラスミドpTRLNGFは、トリプトファン調節遺伝子につながつたトリプトファンオベロンのIrpLポリペプチドのN末端側の6個のアミノ酸とグルタミン酸とフェニルアラニンの合計8個のアミノ酸をコードする遺伝子にヒトNGFをコードする遺伝子が連結された遺伝子を、融合型ヒトNGFとして大腸菌菌体内で発現させることの可能なものである。融合型ヒトNGFの調製方法の一例を次に示す。遺伝子組換え大腸菌HB101[pTRLNGF]を培養して得られた菌体を、超音波処理等で破砕し、その破砕液を遠心分離した際の沈殿物を塩酸グアニジンや尿素等で可溶化し、次に可溶化剤を除去するためにPBS(リン酸塩緩衝液)等に透析して、抗原として用いる融合型ヒトNGFを調製した。

【0008】該抗原による免疫は、該抗原とアジュバントの混合物を、マウスの皮下、静脈、または腹腔に1回あたり40~100 μ g、10日~1ヵ月毎に4~6回注射することで行うことが可能である。

【0009】細胞融合は、ケラーとミルスタインらの方法に準じて行なえる。融合パートナーは、マウスバルブシー(BALB/c)由来のエックス63(X63)細胞、ピースリーユーワン(P3U1)細胞、エヌエスワン(NS-1)細胞およびエスピーツー(SP2)細胞などのミエローマ細胞を利用できる。予め培養した該ミエローマ細胞に対して該抗原で免疫したマウスの脾臓細胞を2~10倍混合して遠心分離した後、上清液を除去してミエローマ細胞と脾臓細胞との混合ベレットを得る。このベレットを良く

3

はくして、予め37℃で加温した30～50% PEG (ポリエチレングリコール; 分子量1000～4000) を加え30～37℃で反応させる。次いで、血清を含まない培地を滴下混合して反応を止める。更に血清を含まない培地を多量に添加混合した後、遠心分離により細胞を回収する。該細胞をHAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン含有) 培地に懸濁し、96ウェルプレートに分注して37℃で培養する。培養3～4日後より2～3日毎に培養液の半量を吸引除去して新鮮なHAT培地を添加して、ハイブリドーマのみを増殖させる。該ハイブリドーマが充分に増殖した後に、該抗原を用いた免疫定量 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay、以下ELISAと略す) 法により、抗ヒトNGF抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングする。そしてスクリーニング陽性ハイブリドーマを限界希釈法によってクローニングし、出現したクローンについても上記ELISA法によりスクリーニングを行ない、抗ヒトNGF抗体産生クローンを得る。尚、遺伝子組換え菌を用いて生産したヒトNGFを検出するためには、その抗体が大腸菌由来タンパク質を認識してはならない。従ってクローンのスクリーニングでは、抗体がヒトNGFを認識し、大腸菌由来タンパク質と交差反応を示さないものを選ぶ必要がある。

【0010】得られたクローンからモノクローナル抗体を得る方法としては次のような方法がある。該クローンを予めプリスタンと投与したBALB/cマウスの腹腔へ移植し、10～14日後に復水を採取することで抗体が得られる。また、該クローンを動物細胞培養装置などで培養することでも抗体を生産できる。そして抗体は、復水または細胞培養液から硫酸分画、イオン交換クロマトグラフィーなどの工程を経て精製することができる。

【0011】

【実施例】以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0012】1. モノクローナル抗体の作製

1) 抗原の調製

大腸菌HB101 [pTRLNGF] (微工研菌寄第11283号) を40mlのM9培地 (NH₄Cl 1g, Na₂HPO₄ 6g, KH₂PO₄ 3g, NaCl 0.5g, CaCl₂・2H₂O 0.015g, MgSO₄・7H₂O 0.5g, カザミノ酸 2.5g, グルコース 5g, 酵母エキス1.5g, トリプトファン0.04g, プロリン 0.1g, チアミン 0.1g, アンピシリン 50mg, 水 1l, pH 7.0) に接種し、37℃で一晩培養した。翌日、大腸菌培養液を、400mlの新鮮なM9 (-Trp) 培地 (前記したM9培地より酵母エキス、トリプトファンを除く) へ移し、37℃で培養した。6.5時間培養後、3-β-インドールアクリル酸 (濃度: 15mg/l) およびカザミノ酸 (濃度: 2.5g/l) を添加し、更に37℃で1晩培養した。培養後の菌体を遠心分離により回収し、PBSで洗浄した後、純水40mlに懸濁し超音波処理によ

4

り破碎した。その破碎液を遠心分離して沈殿物を回収し、塩酸グアニジンで可溶化した後、PBSに透析したものを融合型ヒトNGF抗原として用いた。

【0013】2) 免疫

BALB/c、♀、6週令マウスに以下の方法で免疫を行なった。融合型ヒトNGF84～166μg/ml、アジュバントベプチド30μg/mlになるように調製した混合液を、10～14日間隔で合計5回、マウス1頭あたり0.5mlずつ腹腔内接種した。5回目の免疫から1ヵ月後に、上記混合液をマウス1頭あたり0.5mlずつ腹腔内接種し最終免疫を行なった。

【0014】3) 脾臓細胞の調製

最終免疫から3日後にマウスより無菌的に摘出した脾臓を、ERDF-RD1培地 (極東製薬工業社製) の入ったシャーレに回収し、シャーレを2～3枚換えて脾臓を培地で洗浄した後、ピンセットの背で脾臓を押し潰し、脾臓細胞を培地中に浮遊させた。脾臓細胞浮遊液を15ml遠心管に移し、2～3分放置し組織片を沈殿させた。脾臓細胞を含む上清液を別の遠心管に回収して1600rpm、5分間遠心し、上清液を除去した。細胞をERDF-RD1培地 10mlに懸濁し、細胞濃度を計数後、融合に供した。

【0015】4) ミエローマの調製

融合用のミエローマとしてP3U1細胞を使用した。P3U1細胞は、融合の1週間前より10% FBS (牛胎児血清) 添加ERDF-RD1培地を用いて、培養を開始した。融合当日、培養器より遠心管へP3U1細胞を移して1000rpm、5分間遠心し、上清液を除去した。細胞をERDF-RD1培地 10mlに懸濁し、細胞濃度を計数後、融合に供した。

【0016】5) 細胞融合

脾臓細胞とP3U1細胞を5:1の割合で混合して、1800rpm、5分間遠心し、上清液を除去した。細胞を遠心管壁面に薄く分散させた後、37℃に加温した50%PEG1500/75mM HEPES 1mlを1分間かけて滴下、混合した。更にERDF-RD1培地 1mlを1分間かけて滴下、混合した。最後にERDF-RD1培地8mlを3分間かけて滴下、混合後、1000rpm、5分間遠心し、上清液を除去した。脾臓細胞濃度が5×10⁵個/mlとなるようにHAT培地に懸濁し、96ウェルプレートの各ウェルに100μlずつ分注した。培養4および6日目にHAT培地を50μlずつ添加し、8および10日目に上清液100μlを除去し、HAT培地100μlを添加した。以後、2あるいは3日毎にHT培地 (HAT培地よりアミノプテリンを除いたもの) で培地交換をしながら、ハイブリドーマが増殖するまで培養を続けた。

【0017】6) ハイブリドーマのスクリーニング

肉眼で観察できる程度にハイブリドーマのコロニーが大きくなった段階で、ELISA法により、培養上清液中の抗ヒトNGF抗体の有無を調べた。

【0018】融合型ヒトNGF溶液(10~30 μ g/ml)をELISA用96ウェルプレートに50 μ l/ウェルで添加し、37℃、1時間反応させた。溶液を除去しPBSでウェル内を3回洗浄した後、4倍希釈したブロックエース(大日本製薬社製)を200 μ l/ウェルで添加し、37℃、1時間反応させた。溶液を除去しPBSでウェル内を3回洗浄した後、ハイブリドーマが産生した抗体を含む培養上清液を50 μ l/ウェルで添加し、37℃、1~2時間反応させた。溶液を除去しPBSでウェル内を3回洗浄した後、ビオチン化2次抗体(フナコシ社製)を50 μ l/ウェルで添加し、37℃、1時間反応させた。溶液を除去しPBSでウェル内を3回洗浄した後、あらかじめ調製したアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体(フナコシ社製)の溶液を50 μ l/ウェルで添加し、37℃、30分間反応させた。溶液を除去しPBSでウェル内を3回洗浄した後、o-フェニレンジアミンと0.015%過酸化水素を含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH5.4)を50 μ l/ウェルで添加し、室温で10~15分間放置した後、各ウェルの412nmの吸光度を測定し、陽性ウェル(吸光度の高いウェル)のハイブリドーマを選んだ。

【0019】7) クローニング

陽性ウェル中のハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングした。

【0020】クローニングを行なうハイブリドーマを、10%FBS添加ERDF-RD1培地に17~18個/mlの濃度で懸濁した。その際、フィーダー細胞として脾臓細胞を 1×10^6 個/mlの濃度で添加した。尚、脾臓細胞は、BALB/c、♀、マウスより採取した。10%FBS添加ERDF-RD1培地を50 μ l/ウェルで添加しておいた96ウェルプレートに、上記のハイブリドーマ調製液を50 μ l/ウェルで添加し、培養した。コロニーが1つだけ出現したウェルの培養上清液をELISA法により調べ、抗ヒトNGF抗体を産生しているクローンを選んだ。上記した手順で3個の陽性ハイブリドーマをクローニングし、ハイブリドーマ1-7-78(微工研菌寄第12508号(FERM P-12508))、ハイブリドーマ24-13(微工研菌寄第12509号(FERM P-12509))、およびハイブリドーマ25-11(微工研菌寄第12510号(FERM P-12510))の合計3個の抗ヒトNGF抗体産生クローンを得た。

【0021】2. 抗体の反応性の検討

上記したクローン1-7-78の産生する抗体の反応性を検討した。

【0022】1) クローン1-7-78の培養および培養上清液の回収

クローン1-7-78を10%FBS添加ERDF-RD1培地に懸濁し、T型フラスコ中で培養した。クローンが底面に増殖し、培地が黄変した段階で培養上清液を回収した。

【0023】2) ウェスタンブロット法による抗体の反

応性の検討

抗体検定用の試料には、マウスNGF(東洋紡績社製)、融合型ヒトNGF、遺伝子組換え菌抽出タンパク質、および宿主大腸菌抽出タンパク質を用いた。

【0024】試料をSDSと2-メルカプトエタノール存在下で100℃、3分間の加熱処理後、急冷し、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後、ホライズプロット(アト-社製)を用いて、ゲル中のタンパク質をクリアプロット・P膜(アト-社製)上に転写した。

【0025】転写後の膜をブロックエース原液に浸し、37℃、1時間反応させた。膜を溶液より取りだし、0.01%ツィーン添加PBSで3回洗浄した後、上記培養上清液に浸し37℃、1~2時間反応させた。膜を溶液より取りだし、0.01%ツィーン添加PBSで3回洗浄した後、ビオチン化2次抗体溶液に浸し、37℃、1時間反応させた。膜を溶液より取りだし、0.01%ツィーン添加PBSで3回洗浄した後、あらかじめ調製したアビジン-ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体溶液に浸し、37℃、30分間反応させた。膜を溶液より取りだし、0.01%ツィーンを含むPBSで3回洗浄した後、3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩と0.015%過酸化水素を含むPBSに浸し、室温で約10分間反応させた。膜を蒸留水で3回洗浄して酵素反応を止め、発色パターンを検討した。結果を図1に示す。マウスNGF、融合型ヒトNGFおよび遺伝子組換え菌抽出液タンパク質のレーン(図1の11、12および13)では各NGFの分子量に相当する位置に発色が認められたが、宿主大腸菌抽出タンパク質のレーン(図1の14)では発色が認められなかった。これより抗体は融合型ヒトNGFと反応し、大腸菌抽出タンパク質とは反応しないことが確認できた。このことは、上記抗体を用いたウェスタンブロット法により遺伝子組換え体から抽出したタンパク質中に存在するヒトNGFを特異的に検出できることを示している。また抗体はヒトNGFだけでなく、マウスNGFとも反応することも確認できた。

【0026】3) ドットブロット法による抗体の反応性の検討

マウスNGFについて、SDSと2-メルカプトエタノール存在下で100℃、3分間の変性処理を行なったものと未処理のものを試料として、抗体の反応性を検討した。

【0027】ニトロセルロース膜に、上記2種のNGF溶液(200 μ g/ml程度)を滴下し、室温に30分間放置して、風乾させた後、上記したクリアプロット・P膜に転写後の膜と同様な処理を行なった。対照として培養上清液中の抗体の代わりに、抗マウスNGFモノクローナル抗体(5 μ g/ml、ベリンガー・マンハイム山之内社製)を用いた。結果を図2に示す。図2において、Aは抗ヒトNGFモノクローナル抗体を反応させた

場合、Bは抗マウスNGFモノクローナル抗体を反応させた場合である。これより本発明の抗体は変性処理を行なったマウスNGFには反応し(図2(A)の黒丸22で示す発色)、未処理のマウスNGFには反応しない(図2(A)の点線で示す丸21)ことが確認できた。一方、対照の抗マウスNGFモノクローナル抗体は未処理のマウスNGFには反応し(図2(B)の黒丸21で示す発色)、変性処理を行なったマウスNGFには反応しなかった(図2(B)の点線で示す丸22)。

【0028】以上より、本発明の抗体は公知の抗体と反応性が異なる新規な抗体であることが明らかになった。

【0029】

【発明の効果】本発明により抗ヒトNGFモノクローナル抗体を得ることができ、この抗体を用いれば、従来のモノクローナル抗体では検出できないヒトNGFを検出

することが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【図1】抗ヒトNGFモノクローナル抗体のウエスタンブロット分析結果を示す図。

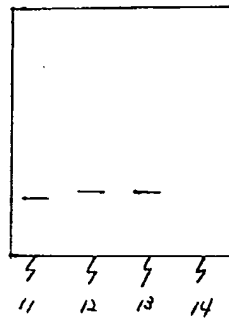
【図2】抗ヒトNGFモノクローナル抗体と抗マウスNGFモノクローナル抗体のドットブロット分析結果を示す図であり、Aは抗ヒトNGFモノクローナル抗体を反応させた場合、Bは抗マウスNGFモノクローナル抗体を反応させた場合である。

【符号の説明】

11…マウスNGF、12…融合型ヒトNGF、13…遺伝子組換え菌抽出タンパク質、14…宿主大腸菌抽出タンパク質、21…未処理マウスNGFの反応結果を示す丸、22…変性処理マウスNGFの反応結果を示す丸。

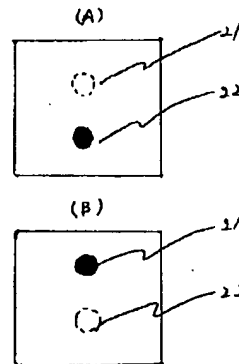
【図1】

図1



【図2】

図2



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// C 1 2 N 5/20

15/06

(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 清水 範夫

埼玉県比企郡鳩山町赤沼2520番地 株式会社
日立製作所基礎研究所内

BEST AVAILABLE COPY